ÉCHANGE GÉNÉTIQUE

I) Transduction

Il s'agit du transfert des gènes bactériens via un bactériophages. Il existe plusieurs bactériophages : bactériophages λ, μ, P1, P22. Le phénomène est principalement étudié chez ceux de E.coli. Il existe des transductions spécialisées et des transductions généralisées. Compte tenu de l'étroite spécificité existant entre les phages et les bactéries, ces transferts se font essentiellement entre bactéries appartenant à une même espèce. Pendant l'excision, le bactériophage entraîne des gènes de la cellule hôte

1.1. Transduction généralisée (exemple : P1)

La transduction généralisée est due à des phages virulents. Lors du cycle productif, l'ADN bactérien est détruit par une désoxyribonucléase d'origine phagique. Au moment de la morphogenèse, un fragment d'ADN bactérien peut être encapsidé par erreur et venir remplacer l'ADN phagique. La taille du fragment d'ADN bactérien doit être proche de celle de l'ADN phagique et elle correspond à environ 1 pour cent du chromosome. Le phage ayant incorporé de l'ADN bactérien ne peut plus de répliquer (phage défectif), mais il peut transférer de l'ADN bactérien à une bactérie réceptrice (les étapes d'adsorption et de pénétration ne sont pas modifiées chez un phage défectif).

Après le transfert d'ADN dans une bactérie réceptrice, deux modalités sont possibles.

- Le fragment d'ADN va s'intégrer par recombinaison homologue et toute la descendance de la bactérie réceptrice portera l'ADN transféré. On dit que la transduction est complète.
- Le fragment d'ADN reste libre, il ne sera pas répliqué, mais les gènes transmis sont fonctionnels et peuvent être exprimés. Lors de la multiplication bactérienne, seule une des deux cellules filles acquiert le fragment d'ADN transféré et, au cours des divisions successives, ce fragment sera peu à peu dilué. On dit que la transduction est abortive.

1.2. Transduction spécialisée (exemple : λ et μ)

Elle est réalisée par des phages tempérés. Lorsque le répresseur est inactivé, un cycle productif succède à un cycle lysogénique. Dans les conditions normales, l'ADN phagique est excisé dans son intégralité. Toutefois, avec une fréquence de l'ordre de 10-6, l'excision est anormale et l'on obtient la libération d'une molécule d'ADN hybride constituée d'un fragment d'ADN phagique et d'un fragment d'ADN bactérien. Ce fragment d'ADN bactérien est adjacent à la zone d'intégration du prophage d'où le nom de transduction spécialisée.

Le phage λ doit circulariser son génome ADN bicaténaire pour s'intégrer, ce qui est possible par ses extrémités cohésives, de plus E.coli possède une zone d'attachement du bactériophage sur son génome. Le phage λ ne transfère que les gènes nécessaires à la fragmentation du galactose (région gal) ou la synthèse de la biotine (région bio), il s'intègre toujours sous forme de prophage entre les régions gal et bio du chromosome de E.coli. Lorsque le cycle lytique du phage λ se déclenche, l'ADN libéré est formé d'ADN viral et des régions gal ou bio (selon que l'excision se décale d'un côté ou de l'autre), puis ce génome va être réencapsulé (si sa taille est trop grande, il va y avoir élimination du deuxième site d'attachement).

Le phage transducteur λgal est un phage défectif, incapable d'initier un cycle productif. Le phage transducteur λbio ne peut plus accomplir un cycle lysogénique, mais il reste capable de donner un cycle productif. Lorsque le phage possède plusieurs sites d'intégration (Enterobacteria phage P2, Enterobacteria phage P22, ...) la transduction devient non spécifique.

Le bactériophage μ est un transposon complexe qui peut s'intégrer totalement au hasard sur une molécule d'ADN bactérien, de nombreux gènes bactériens peuvent être transférés et la transduction localisée a des allures de transduction généralisée, il y a création de différents mutants.

II) Conjugaison

Il s'agit d'un transfert de gène assuré par l'intermédiaire d'un plasmide. Le plasmide est une molécule indépendante des chromosomes qui ne possède pas de fonction essentielle mais peut être importante pour la cellule. La taille d'un plasmide varie de 0,8 kb à 500 kb (mégaplasmide). Certains plasmides peuvent assurer la conjugaison, on parle de plasmides ubiquitaires qui peuvent se transférer d'un type bactérien à un autre (voire à un virus). Les plasmides peuvent être virulents (Vir, Thy) ou posséder des gènes codants des toxines (insecticides, maladie du charbon…) ou produisant des tumeurs.

Les plasmides sont classés selon leur méthode de réplication. Si deux plasmides sont dans la même bactérie et qu'ils peuvent cohabiter, ils appartiennent à deux groupes d'incompatibilités différentes, s'ils ne peuvent pas cohabiter ils appartiennent à deux groupes d'incompatibilité identique.

Les plasmides colicines (Col) sont présents en grande quantité (d'où leur mécanisme de réplication relâchée), ils synthétisent des bactériocines (protéines) inhibant la synthèse chez les autres bactéries. Ces plasmides ne sont pas conjugatifs mais possèdent une région mal+ qui leur assure le mécanisme de transfert, les bactéries les possédant ont un mécanisme de tolérance à la bactériocine.

La conjugaison a été découverte en utilisant un tube en U aux deux côtés séparés par une membrane perméable aux molécules, d'un côté les bactéries sont Tyr+ His-, de l'autre Tyr- et His+. Un facteur F va assurer le transfert de gène d'un donneur F+ vers un accepteur F-, ce transfert étant assuré par un groupe de gènes (tra) de ce facteur F de 100 kb contenant également des gènes codants pour les pilis et pour la coupure de l'ADN de l'hôte. F+ et F- rentrent en contact via les pilis, puis les pilis se dépolymérisent, ce qui induit un rapprochement puis un contact direct des deux bactéries. L'un des deux brins du plasmide de F+ va être coupé au niveau d'OriT, va glisser dans la cellule F-, puis va servir de matrice pour la synthèse du deuxième brin du plasmide chez F-.

Le facteur F peut être intégré au génome, c'est l'état HFR (High Frecency Recomb) qui assure le transfert de génome. Il existe aussi l'état F' où un fragment d'ADN est intégré dans le plasmide. Le facteur F possède des séquences IS (insertion sequence) différentes qui permettent son intégration dans le génome pratiquement partout. La réplication lors du transfert dure environ une heure, si elle est plus courte tout le génome peut ne pas être transféré au cours de l'état HFR.

Les plasmides contiennent également des gènes de résistance aux antibiotiques, on parle de facteur R avec une région RTF (Resist transfert factor) responsable de la conjugaison et des régions R2 déterminantes capables de se transposer.

III) Transformation

La transformation est un transfert génétique au cours duquel de l'ADN bicaténaire, libre, nu et en solution est introduit dans une bactérie réceptrice, puis intégré au chromosome. Pour accepter cet ADN, les cellules doivent acquérir un état de compétence qui apparaît en fin de phase exponentielle de croissance lorsque le taux de nutriments diminue. La transformation peut se faire de manière artificielle.

La transformation a été mise en évidence chez Streptococcus pneumoniae par Frederick Griffith en 1928 (voir schéma 1). Griffith travaillait alors sur l'épidémiologie des infections à Streptococcus pneumoniae. Une quinzaine de gènes ont été identifiés, parmi eux le gène Com. Le phénomène de transformation de l'ADN peut être divisé en deux types :

- transfert long de l'ADN provenant d'une bactérie ou d'un plasmide
- transfection : transfert de l'ADN des bactériophages

3.1. Chez Gram +

Lorsque l’ADN entre en contact avec la cellule, il se produit un signal qui provoque la synthèse d’exonucléase. L’état de compétence nécessite l'apparition à la surface de la cellule d'un complexe protéique constitué d'une endonucléase, d'une exonucléase, de polypeptides capables de lier l'ADN et d'une autolysine. L'autolysine augmente la perméabilité cellulaire et permet au complexe protéique de gagner la surface cellulaire. L'ADN bicaténaire présent dans le milieu extérieur peut alors être capté, il est découpé par l'endonucléase en fragments d'environ 15 Kpb, puis l'exonucléase dégrade l'un des deux brins d'ADN alors que le deuxième brin pénètre dans le cytoplasme grâce à la protéine ComADNss.

3.2. Chez Gram –

Les mécanismes sont proches, mais il existe deux différences essentielles :

Tout d’abord l'état de compétence et la capture de l'ADN sont associés à la présence de petites vésicules membranaires, appelées transformasomes, qui font saillie à l'extérieur de la cellule et permettent à l’ADN de traverser la membrane externe pour gagner l'espace périplasmique où il est dégradé, un unique brin d'ADN gagne le cytoplasme avant d'être incorporé au chromosome.

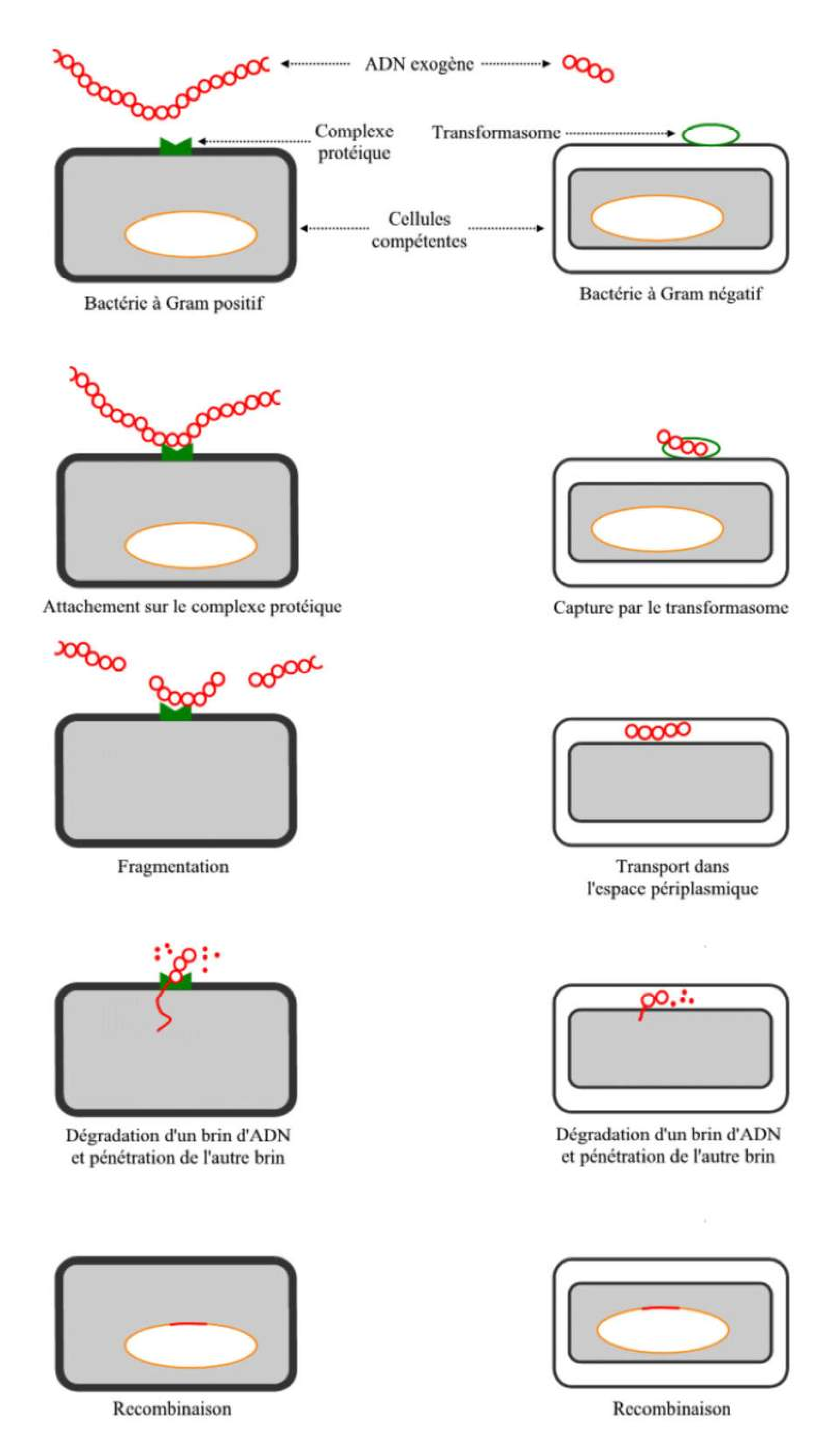
Ensuite, la capture de l'ADN exogène nécessite la reconnaissance de séquences spécifiques de 10 à 11 pb répétées 600 fois dans le génome. Par exemple, la séquence AAGTGCGGTCA pour *Haemophilus influenzae*. Des séquences d'une telle longueur ont peu de chance d'être présentes sur de nombreuses molécules d'ADN ce qui confère une certaine spécificité à la transformation (seul des ADN spécifiques peuvent être transformants).

3.3. Importance de la transformation (hypothèses)

La captation d'un ADN étranger pourrait constituer une source de nucléotides et la transformation n'aurait qu'une importance nutritionnelle. Cependant, on peut remarquer que la dégradation de l'ADN par des enzymes extracellulaires suivie d'une importation des nucléotides serait un système plus simple et plus efficace.

La transformation serait un mécanisme permettant à la bactérie de réparer des lésions de son ADN en incorporant de l'ADN potentiellement homologue. Cette hypothèse est en accord avec le fait que l'ADN transformant doit être proche de celui de la bactéries réceptrice.

La captation d'ADN permettrait à la souche réceptrice d'augmenter la diversité de son potentiel génétique.

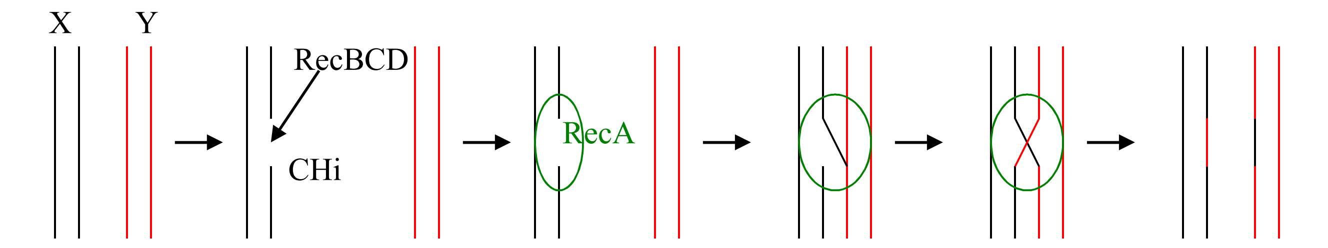

ADN exogène
Complexe
protéique
Transformasome
Cellules
compétentes
Bactérie à Gram positif
Bactérie à Gram négatif
Attachement sur le complexe protéique
Capture par le transformasome
Fragmentation
Transport dans
l'espace périplasmique
Dégradation d'un brin d'ADN
et pénétration de l'autre brin
Dégradation d'un brin d'ADN
et pénétration de l'autre brin
Recombinaison
Recombinaison

IV) Recombinaison

Il s'agit d'un échange de matériel héréditaire, on distingue deux types :

4.1. Recombinaison générale/homologue

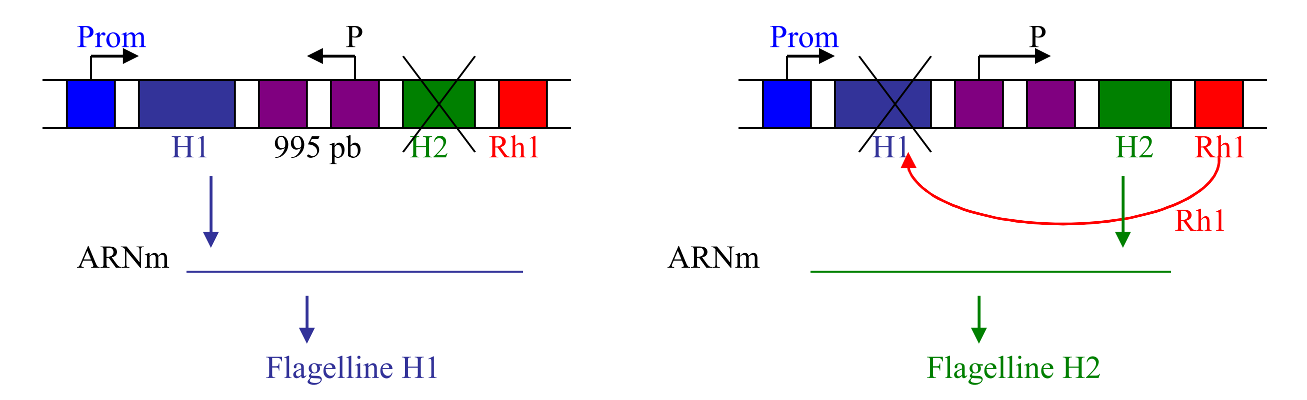
C'est un mécanisme de réarrangement impliquant des séquences d'ADN partageant une grande similarité, par exemple le crossing over entre deux séquences de l'ADN bactérien. Elle se fait sous l'influence de l'enzyme Rec A. L'enzyme gyrase va relâcher l'ADN dans la région concernée pour faciliter le crossing over. Il y a une régularité dans les coupures car les séquences CHi sont reconnues par la RecBCD qui va les couper.



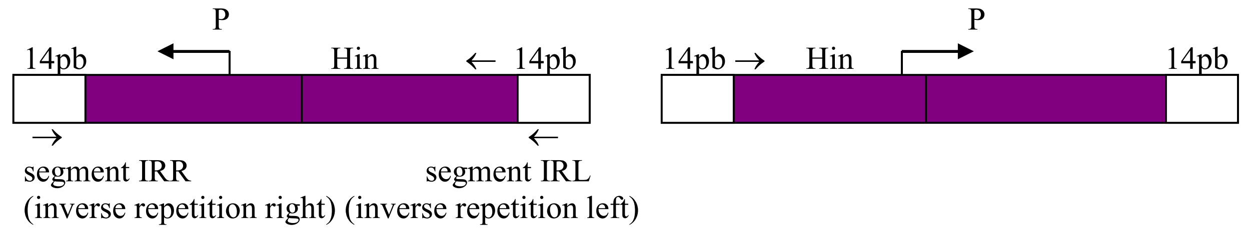
4.2. Recombinaison spécifique/non homologue

On peut prendre pour exemple la variation de phase des flagelles : la bactérie peut changer sa mobilité en modifiant la protéine constituant la flagelle, la flagelline (dans certaines bactéries deux types de flagelline : H1 et H2).

Lors d'une recombinaison, le gène peut s'insérer en 5'→3' ou en 3'→5', ce qui va engendrer des différences. Il peut y avoir inversion de gène et changement de promoteur.



La région codante pour l'enzyme recombinase est Hin, elle a son propre promoteur et la synthèse est permanente dans la cellule.



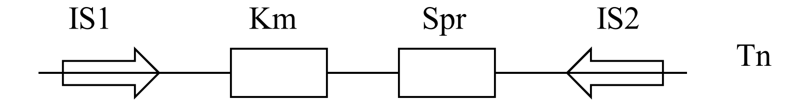
Ce type de recombinaison ne nécessite pas de protéine Rec ni de rupture, elle est spécifique à certains gènes et n'implique pas d'interaction entre des fragments d'ADN identiques.

V) Transposition

La transposition est l'intégration directe d'une séquence de gènes (de taille limitée) au sein d'un génome (chromosomique ou plasmidique) en l'absence d'homologie de séquence nucléotique (recombinaison illégitime), l'insertion de fragment d'ADN est donc indépendante de la séquence ou peut inactiver un gène. Les gènes qui s'additionnent de cette manière sont dits transposables et s'organisent en structures appelées transposons (Tn) qui portent les

déterminants de la transposition (excision, intégration, transposition) et des gènes qui codent pour d'autres fonctions, par exemple la résistance aux antibiotiques. C'est un mécanisme conservatif (excision de transposon) et réplicatif.

Elle est assurée par les transposons : ce sont des éléments mobiles, on parle de répétitions dispersées (transposons et rétrotransposons). Une transposition conservative correspond à un changement de place et une réplicative correspond à une copie. Le transposon le plus simple chez la bactérie contient un seul gène : la transpoxose. Le transposon est constitué d'un fragment d'ADN limité de part et d'autre par des séquences répétitives inversées (IR) appartenant à des séquences d'insertion (IS). Les séquences d'insertion portent les gènes nécessaires à la transposition (transposase, éléments régulateurs de la transposition) et le fragment central porte les marqueurs spécifiques (exemple : gènes de résistance aux antibiotiques).



Un gène de résistance peut donc se déplacer et se transposer sur le génome d'un autre bactérie. On peut observer plusieurs copies du même transposon dans le même génome.

VI) Transcription

6.1. RNA pol

Cette enzyme catalyse la transcription et s'accroche au niveau du promoteur ADN et parcourt le gène en synthétisant l'ARN.

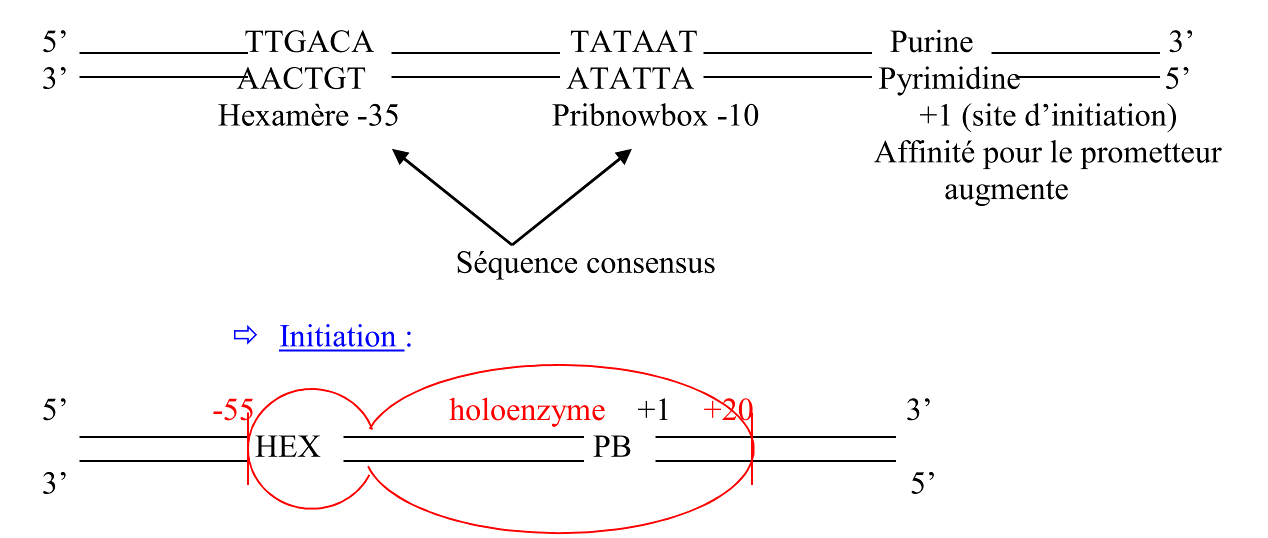
Le brin matrice est le brin 3'>5'. Le RNA pol n'a pas besoin d'amorce mais de 4 NTP : UTP, GTP, CTP, ATP et de Mg^{2+}. L'extrémité 5' de l'ARN est triphosphate, et l'ARN est anti-parallèle à l'ADN.

La RNA pol est composée de six sous unités : 2α, β, β', ω, σ, composant l'holoenzyme de masse 480 KDa. Seule cette holoenzyme initie la transcription en se fixant sur les promoteurs. Quand l'ARN fait 8 à 9 paires de bases, le facteur σ se dissocie de l'enzyme cœur qui va poursuivre la transcription.

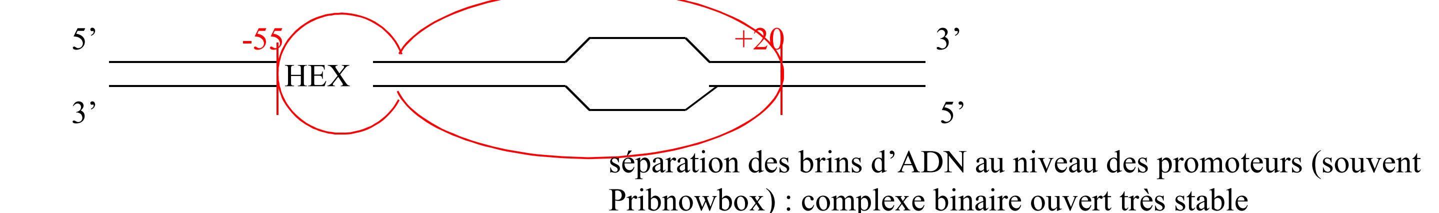
6.2. Structure du promoteur chez E.coli et initiation de la transcription

L'enzyme cœur a une bonne affinité pour l'ADN mais pas d'affinité particulière pour des séquences données. Quand le facteur σ est encore fixé sur l'enzyme cœur, l'holoenzyme va voir son affinité globale pour l'ADN diminuer et son affinité pour des séquences spécifiques des promoteurs augmenter.

⇨ Structure type d'un promoteur d'E.coli :

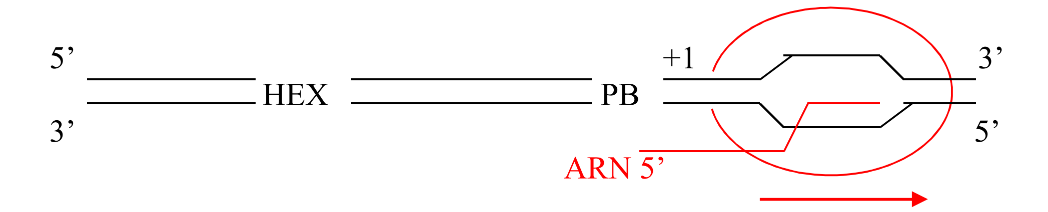


formation d’un complexe binaire fermé



séparation des brins d’ADN au niveau des promoteurs (souvent Pribnowbox) : complexe binaire ouvert très stable

Le début de la transcription nécessitera plusieurs tentatives : des petits RNA (2 à 9 paires de bases) vont souvent se décrocher durant les premiers essais. Lorsque la transcription démarre, le facteur σ va alors quitter le complexe enzymatique et laisser l’enzyme cœur poursuivre l’élongation.



6.3. L’élongation

L’hybride ARN-ADN formé dans la région où l’ARN est synthétisé fait 12 paires de bases, et la zone de recouvrement de l’ADN par l’enzyme cœur va s’étendre de manière variable.

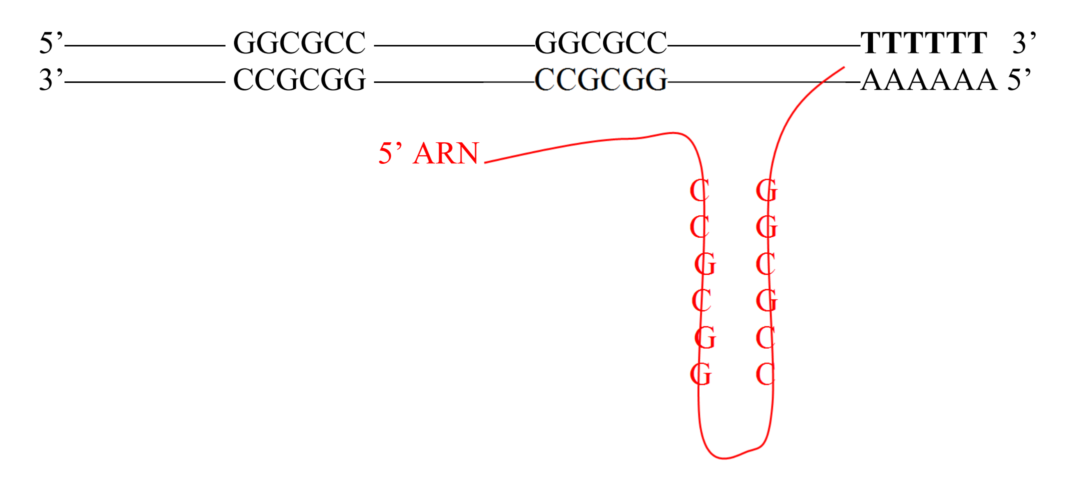
La RNA pol va en effet s’allonger vers l’avant jusqu’à atteindre 35 paires de bases, puis fait une pause et synthétise de l’ARN (7 ou 8 paires de bases), avant d’être compressée depuis l’arrière pour retrouver une taille de 27-28 paires de bases, après quoi elle s’allonge jusqu’à 35 paires de bases, etc. (déplacement d’une chenille)

L’enzyme cœur va se fixer sous l’intervention de nus A (dimère), nus B et nus C (hétérodimères), qui jouent un rôle dans la terminaison.

6.4. Terminaison de la transcription

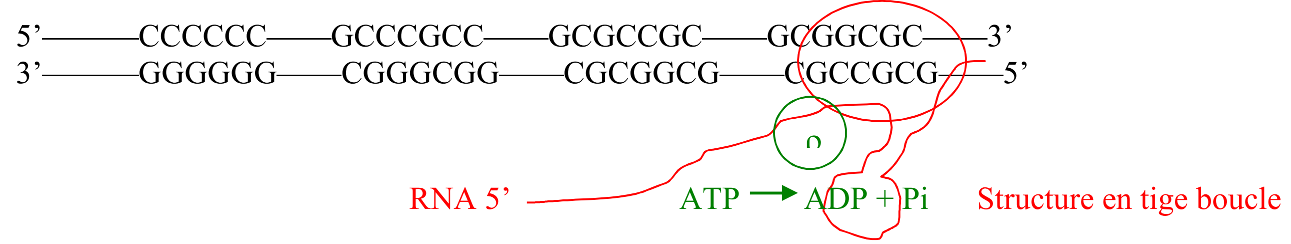
Elle a toujours lieu au niveau du même nucléotide sur le gène. Le complexe transcriptionnel se dissocie au sein de séquences nucléotidiques spécifiques, les terminateurs. On distingue deux types de terminateurs :

- ⇨ Les terminateurs ρ indépendants, centrant 20 à 30 nucléotides avant le point de terminaison et constitués de séquences palindromiques (identiques sur les deux brins opposés) riches en G et C suivies par une séquence de 6 à 8 A à la fin, formant une tige boucle qui va empêcher la progression de la RNA pol. La région riche en A va donner une région de l’ARN riche en U, et la liaison U-T sera facile à rompre.



⇨ Les terminateurs ρ dépendants, liés à la protéine ρ qui va s'attacher à un site spécifique de l'ARN sur lequel elle se déplace en suivant le complexe de transcription. ρ est un hexamère à fonction ATPase ARN dépendante et hydrolyse l'ATP pour recevoir l'énergie nécessaire à son déplacement sur le structure de terminaison. Celle-ci est composée :

- De séquences de 50 à 90 paires de bases riches en C, pauvres en G et à faible consensus.
- De séquences palindromiques riches en G/C (mais il n'y a pas de séquences riches en A).



L'enzyme cœur est ainsi bloquée et le facteur ρ va provoquer la dissociation du complexe transcriptionnel. Cette enzyme cœur va être recyclée et se complexer avec sa sous unité σ pour initier une nouvelle transcription.

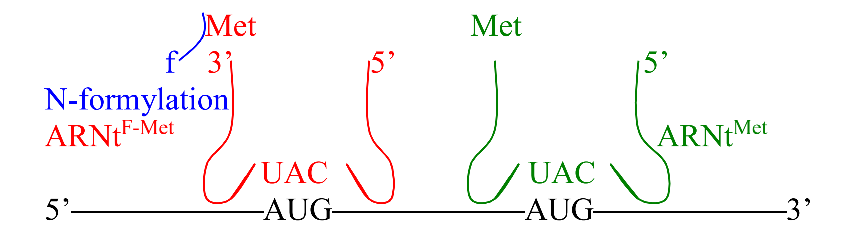
VII) Traduction

7.1. L'initiation

Elle débute sur le premier codon de la séquence codante : AUG (méthionine) ou GUG (valine). L'acyle d'acide aminé méthionine est modifiée par l'enzyme N-formyl-méthionine pour former une formine méthionine (F-Met). Deux ARNt sont capables de charger la méthionine : l'ARNt^{Met} et l'ARNt$^{F\text{-}Met}$. Ils sont pris en charge par le même aminoacylsynthétase et donnent le met-ARNt^{Me} et le met-ARNt$^{F\text{-}Met}$.

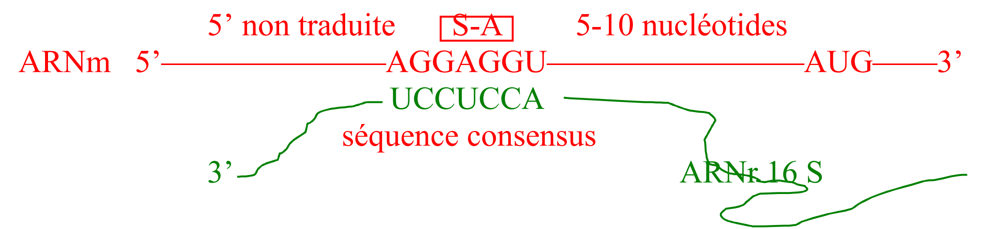
met-ARNt$^{F\text{-}Met}$ $\xrightarrow{\text{N-formylation}}$ F-met-ARNt$^{F\text{-}Met}$

Le premier codon lu (AUG) est pris en charge par l'ARNt qui va charger la méthionine (ARNt$^{F\text{-}Met}$) et va le formyler. Les ARNt suivants vont reconnaître les autres AUG et apporter les méthionines sans les formyler, la formylation est donc spécifique du premier codon.



Après la traduction, il y a maturation des protéines : l'acide aminé de l'extrémité NH_2 terminal est généralement modifié ou excisé quand la synthèse protéique en est à 10 à 15 acides aminés.

Chez les procaryotes, la région 5' non traduite de l'ARNm contient une séquence, la séquence Shine-Dalgarno, devant l'AUG initiateur qui va être capable de s'appareiller avec le 3' ARNr 16 S, elle correspond à la séquence de liaison du ribosome.



L'initiation va se dérouler en plusieurs étapes. La cellule contient donc un pool ribosome 30S + 50S qui va s'associer en 70S et inversement, le 70S va se dissocier. Trois facteurs protéiques (facteurs d'initiation IF) vont intervenir :

- ⇨ IF3, qui a deux rôles ; il se lie tout d'abord à la sous unité 30S libre et va permettre son changement de conformation : la sous unité 30S ne va plus pouvoir s'associer avec la sous unité 50S mais sera capable de lier l'ARNm, il va ensuite reconnaître la séquence S-D en présence de ARNr 16S.
- ⇨ IF2 va reconnaître et lier le F-met-ARNt pour l'apposer au complexe sous unité 30S / IF3 / ARNm, il va installer l'anti codon UAC porté par l'ARNt en face de l'AUG (qui est donc le premier codon traduit). Son action va entraîner une consommation d'énergie : l'IF2 va activer une protéine de la sous unité 30S qui va elle-même activer la GTPase ARN dépendante en rejoignant la sous unité 50S.

7.2. L'élongation

À ce stade, l'ARNt formyl-Met occupe le site P de la sous-unité 30S et l'anti-codon est appareillé avec le codon, le cadre de lecture est donc défini sans ambiguïté. On trouve deux facteurs d'élongations :

- EF-Tu qui permet le passage de l'ARNt au site A du ribosome
- EF-Tp qui permet la régénération d'un complexe EF-Tu/GTP

Pendant cette élongation, la peptidyl-transférase va permettre que l'acide aminé f-Met porté par l'ARNt accroché au site P du ribosome soit transféré au site A et va aussi permettre une liaison peptidique. L'ARNt déchargé va quitter le site P, il y a translocation du peptidyl-ARNt du site A vers le site P, nécessitant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de la GTP associée à un facteur d'élongation EF-G.

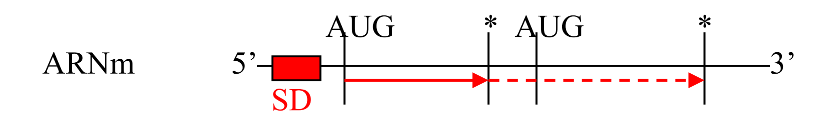
7.3. Terminaison

Elle a lieu au niveau d'un codon STOP (UAA, UAG, UGA) quand ce codon occupe le site A du ribosome car il n'existe pas d'ARNt portant un anti-codon correspondant au codon STOP, il y a donc arrêt de la traduction. La terminaison est également assurée par la protéine RF, un facteur de relargage qui va agir au niveau du site A si le site P est occupé par de l'ARNt chargé d'un polypeptide. Il y a relargage du polypeptide complet, de l'ARNt, des sous-unités 30 S et 50 S : le complexe se dissocie. L'énergie nécessaire est fournie sous forme de GTP. Il existe 3 formes de RF :

- RF 1 qui reconnaît UAA et UAG
- RF 2 qui reconnaît UAA et UGA
- RF 3 qui facilite l'action de RF 1 et RF 2

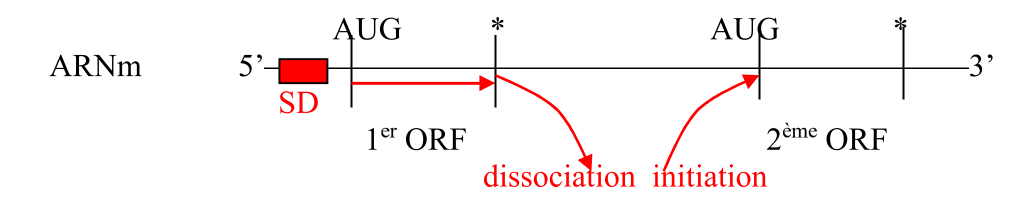
On constate deux cas de figures si l'ARNm est polycistronique (qui donne naissance à plusieurs protéines, et donc porte davantage de cadres de lecture ouverts ORF).

1) Si le codon AUG du deuxième ORF est proche du codon STOP du premier ORF, il n'y a pas de dissociation du ribosome mais souvent une perte d'efficacité pour le deuxième ORF.



1er ORF 2ème ORF

2) Si le codon AUG du deuxième ORF est éloigné du codon STOP du premier ORF, il y a dissociation du ribosome au niveau du premier codon STOP et une nouvelle initiation au niveau du deuxième codon initiateur.



VIII) Les mutations

Il s'agit d'un changement dans la composition des paires de bases et des acides nucléiques (ADN et ARN). Une mutation spontanée est rare, sa fréquence est de 10^7 à 10^{11}. Il existe dans la nature des agents physiques et chimiques, les mutagènes, qui peuvent augmenter le taux de mutations d'un facteur 1000, le mécanisme est différent selon ces agents. Parmi les agents physiques on trouve les radiations ionisantes, UV, etc… Les mécanismes des agents chimiques est soit direct, soit indirect, ils peuvent transformer une base d'ADN/ARN en forme modifiée, comme l'hydroxylamine qui cible la cytosine ou la nitrosogumidine est un agent cancérogène.

La mutagenèse est la création artificielle de mutation. On peut utiliser une détection directe pour repérer une mutation, par exemple avec des tests d'antibiotiques avec un tube témoin et un tube contenant une colonie expérimentale, on peut ainsi détecter les bactéries ayant acquis une résistance aux antibiotiques.

Certaines mutations empêchent l'utilisation de certaines enzymes et par exemple la synthèse d'acides aminés, pour cela on va faire une détection indirecte. Les colonies sont étalées contenant un milieu riche pour avoir de 100 à 1000 colonies. Pour isoler un mutant incapable de se développer son arginine, on va réaliser une culture en miroir : on prend une empreinte des colonies contenues dans la boîte initiale que l'on appose sur une boîte dépourvue d'arginine et on compare l'évolution des colonies dans les deux boîtes. Cette méthode permet de repérer les cancers.

test de Ames : http://fr.wikipedia.org/wiki/Test_d'Ames

On prend un échantillon de souche et deux boîtes sans histidine, une boîte témoin et une boîte contenant un milieu de croissance dans lequel on ajoute la molécule à tester. Les bactéries dans la deuxième boîte vont muter si la molécule ajoutée est mutagène, on va comparer les colonies obtenues à celles de la boîte témoin. Mais certaines molécules cancérogènes ne peuvent pas être détectées par cette méthode, le problème est lié au fait que, dans le corps humain, le foie est impliqué dans la dégradation des produits et peut transformer une molécule X en une molécule X* cancérigène. Ainsi dans les milieux de croissance, on ajoute des extraits de foie pour avoir les réactions enzymatique obtenues dans les conditions du corps humain.

IX) La réplication de l'ADN

(voir la Bio mol 1)